

PCT/JP03/10628

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

22.08.03

REC'D 10 OCT 2003

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 9月26日

出願番号
Application Number: 特願2002-280118
[ST. 10/C]: [JP2002-280118]

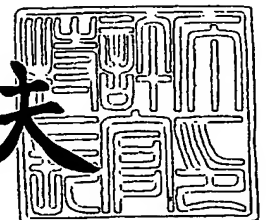
出願人
Applicant(s): 理化学研究所
株式会社医学生物学研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月26日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 A21613A
【提出日】 平成14年 9月26日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内

【氏名】 宮脇 敦史

【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区徳丸3-10-8スカイプラザ202号室

【氏名】 唐澤 智司

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

【識別番号】 390004097

【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所

【代理人】

【識別番号】 110000109

【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 170347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205404

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

(1) 紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が508 nm (緑) 及び578 nm (赤) であり、蛍光極大波長が518 nm (緑) 及び588 nm (赤) である;

(2) 508 nmにおけるモル吸光係数(緑) が $102250\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ であり、578 nmにおけるモル吸光係数(赤) が $76950\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ である;

(3) 量子収率(蛍光) が0.43 (緑) 及び0.51 (赤) である; 及び

(4) 緑色(508 nm) のpH感受性についてpKaが5.8であり、赤色(578 nm) のpH感受性についてpKaが6.5である。

【請求項2】 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列; 又は、

(b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列:

【請求項3】 以下の何れかのDNA。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするDNA; 又は、

(b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加を有するアミノ酸配列をコードし、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA:

(c) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA; 又は、

(d) 配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び/又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA:

【請求項4】 請求項3に記載のDNAを有する組み換えベクター。

【請求項5】 請求項3に記載のDNA又は請求項4に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。

【請求項 6】 請求項 1 又は 2 に記載の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛍光蛋白質。

【請求項 7】 他の蛋白質が細胞内に局在する蛋白質である、請求項 6 に記載の融合蛍光蛋白質。

【請求項 8】 他の蛋白質が細胞内小器官に特異的な蛋白質である、請求項 6 又は 7 に記載の融合蛍光蛋白質。

【請求項 9】 請求項 6 から 8 の何れかに記載の融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法。

【請求項 10】 請求項 1 又は 2 に記載の蛍光蛋白質、請求項 3 に記載の DNA、請求項 4 に記載の組み換えベクター、請求項 5 に記載の形質転換体、又は請求項 6 から 8 の何れかに記載の融合蛍光蛋白質を含む、蛍光試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な蛍光蛋白質に関する。より詳細には、本発明は、アザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) 由来の新規な蛍光蛋白質及びその利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

クラゲのエクオレア・ビクトリア (*Aequorea victoria*) に由来する緑色蛍光蛋白質 (GFP) は、生物系において多くの用途を有する。最近、ランダム突然変異誘発法および半合理的 (semi-rational) 突然変異誘発法に基づいて、色を変化させたり、折りたたみ特性を改善したり、輝度を高めたり、あるいは pH 感受性を改変したといった様々な GFP 変異体が作製されている。遺伝子組み換え技術により他の蛋白質を GFP 等の蛍光蛋白質に融合させて、それらの発現および輸送のモニタリングを行うことが行われている。

【0003】

最もよく使用される GFP 変異体の一つとして黄色蛍光蛋白質 (YFP) が挙

げられる。YFPは、クラゲ (Aequorea) GFP変異体の中でも最長波長の蛍光を示す。大部分のYFPの ϵ および Φ は、それぞれ60,000~100,000M⁻¹cm⁻¹および0.6~0.8であり (非特許文献1を参照)、これらの値は、一般的な蛍光団 (フルオレセインおよびローダミンなど) の値に匹敵する。従ってYFPの絶対的輝度の改善は、ほぼ限界に達しつつある。

【0004】

また、GFP変異体の他の例として、シアン蛍光蛋白質 (CFP) があり、E CFP (enhanced cyan fluorescent protein) が知られている。また、イソギンチャク (Discoma sp.) からは赤色蛍光蛋白質 (RFP) も単離されており、Das Redが知られている。このように蛍光蛋白質は、緑色、黄色、シアン色、赤色の4種が次々と開発されスペクトルの範囲は大幅に広がっている。

【0005】

【非特許文献1】

Tsien, R. Y. (1998). Ann. Rev. Biochem. 67, 509-544

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、刺胞動物、アザミハナガタサンゴ (Scolymia Vitiensis) に由来する新規な一次構造を有する蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために本発明者らは鋭意検討し、アザミハナガタサンゴ (Scolymia Vitiensis) 由来のcDNAライブラリーと、既知の蛍光蛋白質のアミノ酸配列情報に基づいて設計したプライマーとを用いてスクリーニングを行った結果、新規な蛍光蛋白質をコードする遺伝子をクローニングすることに成功した。さらに本発明者らは、得られた蛍光蛋白質の蛍光特性を調べた結果、当該蛍光蛋白質が独特の蛍光特性を有することを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0008】

即ち、本発明によれば、アザミハナガタサンゴ (Scolymia Vitiensis) 由来の

下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が 508 nm (緑) 及び 578 nm (赤) であり、蛍光極大波長が 518 nm (緑) 及び 588 nm (赤) である；
- (2) 508 nm におけるモル吸光係数 (緑) が $102250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、578 nm におけるモル吸光係数 (赤) が $76950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である；
- (3) 量子収率 (蛍光) が 0.43 (緑) 及び 0.51 (赤) である；及び
- (4) 緑色 (508 nm) の pH 感受性について pK_a が 5.8 であり、赤色 (578 nm) の pH 感受性について pK_a が 6.5 である。

【0009】

本発明の別の態様によれば、以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が提供される。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列；

【0010】

本発明のさらに別の態様によれば、以下の何れかの DNA が提供される。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列をコードし、かつ蛍光蛋白質をコードする DNA；

- (c) 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA；又は、
- (d) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光蛋白質をコードする DNA；

【0011】

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の DNA を有する組み換えベクターが提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の DNA 又は組み換えベクターを有

する形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛍光蛋白質が提供される。好ましくは、他の蛋白質は、細胞内に局在する蛋白質である。さらに、好ましくは、他の蛋白質は、細胞内小器官に特異的な蛋白質である。

【0012】

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の蛍光蛋白質、DNA、組み換えベクター、形質転換体、又は融合蛍光蛋白質を含む、蛍光試薬キットが提供される。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(1) 本発明の蛍光蛋白質

本発明の蛍光蛋白質は、アザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) 由来のものであり、下記の特性を有することを特徴とする。

(1) 紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が508nm (緑) 及び578nm (赤) であり、蛍光極大波長が518nm (緑) 及び588nm (赤) である；

(2) 508nmにおけるモル吸光係数 (緑) が $102250\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であり、578nmにおけるモル吸光係数 (赤) が $76950\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ である；

(3) 量子収率 (蛍光) が0.43 (緑) 及び0.51 (赤) である；及び

(4) 緑色 (508nm) のpH感受性についてpKaが5.8であり、赤色 (578nm) のpH感受性についてpKaが6.5である。

【0014】

アザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) は固着性の単体サンゴで、小型の個体は鉢型で円形であるが、大きくなると楕円形になる。サンゴ個体の中心に

は大きなスポンジ状の軸柱があり、莖壁から長い障壁がほぼ一定の傾斜で中心に伸びる。隔壁には大きな鋸歯があり、外からもその様子がうかがえる。昼間はポリプを開かない。色彩は普通暗緑色であるが赤色なども稀に見られる。アザミハナガタサンゴ属は約4種が知られているが、日本周辺海域には1種が分布している。

【0015】

本発明の蛍光蛋白質は、以下の実施例で示す通り、紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が508nm（緑）及び578nm（赤）であり、蛍光極大波長は518nm（緑）及び588nm（赤）である。また、508nmにおけるモル吸光係数（緑）は $102250\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であり、578nmにおけるモル吸光係数（赤）は $76950\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ である。

本発明の蛍光蛋白質は、紫外光によって色が変わることを特徴とし、光によって特定の細胞、器官又は蛋白質のマーキング（optical marking）が可能である。

。

【0016】

本発明の蛍光蛋白質の具体例としては、以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が挙げられる。

（a）配列番号1に記載のアミノ酸配列；又は、

（b）配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列：

【0017】

本明細書で言う「1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

【0018】

本明細書で言う「蛍光を有する」とは、蛍光を発することができる全ての場合を包含し、蛍光強度、励起波長、蛍光波長、pH感受性などの諸特性は、配列番

号1に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と比較して、変動していてもよいし、同様のままでもよい。

【0019】

本発明の蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNA入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列並びに配列番号2に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いて上記したような各種の公知の蛍光蛋白質のcDNAクローンを鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAを取得することができる。本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAの一部の断片を上記したPCRにより得た場合には、作製したDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の蛍光蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の蛍光蛋白質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

【0020】

(2) 本発明のDNA

本発明によれば、本発明の蛍光蛋白質をコードする遺伝子が提供される。

本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAの具体例としては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

- (a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、
- (b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列をコードし、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA；
- (c) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA；又は、
- (d) 配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA；

【0021】

本発明のDNAは、例えばホスホアミダイト法などにより合成することができるし、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって製造することもできる。本発明のDNA又はその断片の作製方法については、本明細書中上述した通りである。

【0022】

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いるPCR、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有するDNAを構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、並びにCurrent Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)に記載されている。

【0023】

(3) 本発明の組み換えベクター

本発明のDNAは適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター（例えばプラスミド等）でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

【0024】

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明のDNAは、転写に必要な要素（例えば、プロモーター等）が機能的に連結されている。プロモータは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜することができる。

【0025】

細菌細胞で作動可能なプロモータとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子(Bacillus stearothermophilus maltog

enic amylase gene)、バチルス・リケニホルミス α アミラーゼ遺伝子(Bacillus licheniformis alpha-amylase gene)、バチルス・アミロリケファチエンス・BAN アミラーゼ遺伝子(Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子(Bacillus Subtilis alkaline protease gene)もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子(Bacillus pumilus xylosidase gene)のプロモータ、またはファージ・ラムダの P_R 若しくは P_L プロモータ、大腸菌の lac、trp 若しくは tac プロモータなどが挙げられる。

【0026】

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、SV40 プロモータ、MT-1 (メタロチオネイン遺伝子) プロモータ、またはアデノウイルス 2 主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P10 プロモータ、オートグラフィア・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性タンパクプロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子 1 プロモータ、またはバキュウロウイルス 39 K 遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、TP11 プロモータ、ADH2-4c プロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ADH3 プロモータまたは tpiA プロモータなどがある。

【0027】

また、本発明の DNA は必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主については TP11 トーミネータ若しくは ADH3 トーミネータのような適切なトーミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えば SV40 またはアデノウイルス 5 E1 b 領域由来のもの)、転写エンハンサ配列(例えば SV40 エンハンサ) および翻訳エンハンサ配列(例えばアデノウイルス VA RNA をコードするもの)のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にする DNA 配列を具備してもよく、その一例としては SV40 複製起点 (

宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。

【0028】

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカを含有してもよい。選択マーカとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) またはシゾサッカロマイセス・ポンベ TPI 遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

本発明の DNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび／または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

【0029】

(4) 本発明の形質転換体

本発明の DNA 又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明の DNA または組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明の DNA 構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

【0030】

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行なえばよい。

哺乳類細胞の例としては、HEK293細胞、HeLa細胞、COS細胞、BHK細胞、CHL細胞またはCHO細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入されたDNA配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

【0031】

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシズサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはサッカロマイセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*) 等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

【0032】

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスポラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

【0033】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる (例えば、*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*; 及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、*Bio/Technology*, 6, 47(1988)等に記載)。

【0034】

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞である Sf 9、Sf 21 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞である Hi Five (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

【0035】

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の蛍光融合蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0036】

(5) 本発明の蛍光蛋白質及びそれを含む融合蛍光蛋白質の利用

本発明は蛍光蛋白質を他の蛋白質と融合させることにより、融合蛍光蛋白質を構築することができる。

本発明の融合蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列及び配列番号2に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、本発明の蛍光蛋白質の遺伝子を含むDNA断片を鋳型にしてPC

Rを行うことにより、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAを構築するのに必要なDNA断片を作製することができる。また同様に、融合すべき蛋白質をコードするDNA断片も入手する。

【0037】

次いで、これらのDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の融合蛍光蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の融合蛍光蛋白質を産生することができる。

【0038】

本発明の蛍光蛋白質は、特に、標識としての利用価値が高い。即ち、本発明の蛍光蛋白質を被検アミノ酸配列との融合蛋白質として精製し、マイクロインジェクション法などの手法により細胞内に導入し、該融合蛋白質の分布を経時的に観察すれば、被検アミノ酸配列の細胞内におけるターゲッティング活性を検出することが可能である。

【0039】

本発明の蛍光蛋白質を融合させる他の蛋白質（被検アミノ酸配列）の種類は特に限定されるものではないが、例えば、細胞内に局在する蛋白質、細胞内小器官に特異的な蛋白質、ターゲティングシグナル（例えば、核移行シグナル、ミトコンドリアプレ配列）等が好適である。なお、本発明の蛍光蛋白質は、マイクロインジェクション法などにより細胞内に導入する以外に、細胞内で発現させて用いることも可能である。この場合には、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが発現可能に挿入されたベクターが宿主細胞に導入される。

【0040】

また、本発明の蛍光蛋白質は、レポーター蛋白質としてプロモーター活性の測定に用いることも可能である。即ち、被検プロモーターの下流に、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが配置されたベクターを構築し、これを宿主細胞に導入し、該細胞から発せられる本発明の蛍光蛋白質の蛍光を検出することにより、被検プロモーターの活性を測定することが可能である。被検プロモーターとしては、宿主細胞内で機能するものであれば、特に制限はない。

【0041】

上記被検アミノ酸配列のターゲティング活性の検出やプロモーター活性の測定において用いられるベクターとしては、特に制限はないが、例えば、動物細胞用ベクターでは、「pNEO」(P. Southern, and P. Berg (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:327)、「pCAGGS」(H. Niwa, K. Yamamura, and J. Miyazaki. Gene 108, 193-200(1991))、「pRc/CMV」(インビトロゲン社製)、「pCDM8」(インビトロゲン社製)などが、酵母用ベクターでは、「pRS303」, 「pRS304」, 「pRS305」, 「pRS306」, 「pRS313」, 「pRS314」, 「pRS315」, 「pRS316」(R. S. Sikorski and P. Hieter (1989) Genetics 122: 19-27)、「pRS423」, 「pRS424」, 「pRS425」, 「pRS426」(T. W. Christianson, R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Shero, and P. Hieter (1992) Gene 110: 119-122)などが好適に用いられる。

【0042】

また、使用可能な細胞の種類も特に限定されず、各種の動物細胞、例えば、L細胞、BalbC-3T3細胞、NIH3T3細胞、CHO(Chinese hamster ovary)細胞、HeLa細胞、NRK(normal rat kidney)細胞、「*Saccharomyces cerevisiae*」などの酵母細胞や大腸菌(*E. coli*)細胞などを使用することができる。ベクターの宿主細胞への導入は、例えば、リン酸カルシウム法やエレクトロポレーション法などの常法により行うことができる。

【0043】

上記のようにして得た、本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質(蛋白質Xとする)とを融合させた融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させ、発する蛍光をモニターすることにより、細胞内における蛋白質Xの局在や動態を分析することが可能になる。即ち、本発明の融合蛍光蛋白質をコードするDNAで形質転換またはトランスフェクトした細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより細胞内における蛋白質Xの局在や動態を可視化して分析することができる。

【0044】

例えば、蛋白質Xとして細胞内オルガネラに特異的な蛋白質を利用することにより、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、分泌小胞、ペルオキシソームなどの分布や動きを観察できる。

また、例えば、神経細胞の軸索、樹状突起などは発生途中の個体の中で著しく複雑な走向の変化を示すので、こういった部位を蛍光ラベルすることにより動的解析が可能になる。

【0045】

本発明の蛍光蛋白質の蛍光は、生細胞のまま検出することが可能である。この検出は、例えば、蛍光顕微鏡（カールツァイス社 アキシオフォト フィルターセット09）や画像解析装置（ATTO デジタルイメージアナライザー）などを用いて行うことが可能である。

顕微鏡の種類は目的に応じて適宜選択できる。経時変化を追跡するなど頻回の観察を必要とする場合には、通常の落射型蛍光顕微鏡が好ましい。細胞内の詳細な局在を追及したい場合など、解像度を重視する場合は、共焦点レーザー顕微鏡の方が好ましい。顕微鏡システムとしては、細胞の生理状態を保ち、コンタミネーションを防止する観点から、倒立型顕微鏡が好ましい。正立顕微鏡を使用する場合、高倍率レンズを用いる際には水浸レンズを用いることができる。

【0046】

フィルターセットは蛍光蛋白質の蛍光波長に応じて適切なものを選択できる。本発明の蛍光蛋白質の場合、励起極大波長が508nm、蛍光極大波長が518である緑色を検出する場合は、励起光490～510nm、蛍光510～530nm程度のフィルターを使用することが好ましい。また、励起極大波長が578nmであり、蛍光極大波長が588nmである赤色を検出する場合は、励起光570～580nm、蛍光580～595nm程度のフィルターを使用することが好ましい。

【0047】

また、蛍光顕微鏡を用いた生細胞での経時観察を行う場合には、短時間で撮影を行うべきなので、高感度冷却CCDカメラを使用する。冷却CCDカメラは、CCDを冷却することにより熱雑音を下げ、微弱な蛍光像を短時間露光で鮮明に撮影することができる。

【0048】

(6) 本発明のキット

本発明によれば、本明細書に記載した蛍光蛋白質、融合蛍光蛋白質、DNA、組み換えベクター又は形質転換体から選択される少なくとも1種以上を含むことを特徴とする、細胞内成分の局在の分析及び／又は生理活性物質の分析のためのキットが提供される。本発明のキットは、それ自体既知の通常用いられる材料及び手法で調製することができる。

蛍光蛋白質又はDNAなどの試薬は、適当な溶媒に溶解することにより保存に適した形態に調製することができる。溶媒としては、水、エタノール、各種緩衝液などを用いることができる。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【0049】

【実施例】

実施例1：珊瑚からの新規蛍光蛋白遺伝子(Momiji)の単離

(1) total RNAの抽出

蛍光を放つ珊瑚より蛍光蛋白遺伝子の単離を行った。材料にはアザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) を用いた。アザミハナガタサンゴをハンマーで碎き、碎いたサンゴ10グラムに"TRIzol" (GIBCO BRL) を15 ml 加えて攪拌し、1500 x gで10分間遠心した。上清にクロロホルム 3 ml を加え、15秒間攪拌した後3分間静置した。7500 x gで15分間遠心した。上清にイソプロパノール7.5 ml を加え、15秒間攪拌した後10分間静置した。17000 x gで10分間遠心した。上清を捨て70%エタノールを6 ml加えて、17000 x gで10分間遠心した。上清を捨て沈殿をDEPC水200 μ lで溶解した。DEPC水で溶解したtotal RNAを100倍に希釈してO.D. 260とO.D. 280の値を測定してRNA濃度を測った。230 μ gのtotal RNAを得た。

【0050】

(2) First strand cDNAの合成

total RNA 3 μ gを使用し、First strand cDNAの合成キット"Ready To Go" (Amersham Pharmacia)によりcDNA(33 μ l)を合成した。

【0051】

(3) Degenerated PCR

合成したFirst strand cDNA (33 μ l)のうち3 μ lを鋳型としてPCRを行った。
プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直し作製した。

【0052】

使用プライマー

5'- ATCAAGNTNWRATGGAAGG -3' (primer1) (配列番号3)

5'- ACVGGDCCATYDGVAAGAAARTT-3' (primer2) (配列番号4)

RはA又はGを示し、YはC又はTを示し、VはA,C又はGを示し、DはA,G又はTを示す。

【0053】

PCR反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X 10 taq バッファー	5 μ l
2.5m M dNTPs	4 μ l
100 μ M primer1	1 μ l
100 μ M primer2	1 μ l
ミリQ	35 μ l
taq polymerase(5 U/ μ l)	1 μ l

【0054】

PCR反応条件

94 $^{\circ}$ C 1分(PAD)

94 $^{\circ}$ C 30 秒 (変性)

52 $^{\circ}$ C 30 秒 (プライマーの鋳型へのアニーリング)

72 $^{\circ}$ C 1 分 (プライマー伸長)

上記3ステップを30サイクル行い、アニーリング温度を1サイクルごとに0.3 $^{\circ}$ C下げた。30サイクル時の温度は43 $^{\circ}$ C。

72 $^{\circ}$ C 7 分 (最後の伸長)

4 $^{\circ}$ Cで保持

【0055】

一回目のPCR反応で得られた増幅産物1 μ lをテンプレートとして、もう一度同じ条件でPCRを行った。アガロースゲル電気泳動で予想された大きさの350 bpのバンドを切り出し、精製した。

【0056】

(4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製したDNA断片をpT7-blue vector (Novagen)にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてX-gal存在下でブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌よりplasmid DNAを精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してそのDNA塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5'-RACE法および3'-RACE法による遺伝子全長のクローニングを行った。

【0057】

(5) 5'-RACE法

Degenerated PCRで得られたDNA断片の5'側の塩基配列を決定するために5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL)を用いて、5'-RACE法を行った。鋳型として1)で調整したtotal RNAを3 μ g使用した。DC-tailed cDNAの一回目の増幅には

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' (primer3) (配列番号5)

5'-AGTTCACACCATGATATTCAATATCATA-3' (primer4) (配列番号6)

のプライマーを用いた。

Iはイノシンを示す。

【0058】

二回目の増幅には

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (primer5) (配列番号7)

5'-TCTTCGTAAGTCATGCTTCGTTTC-3' (primer6) (配列番号8)

のプライマーを用いた。PCR反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

【0059】

アガロースゲル電気泳動で、増幅された400 bpのバンドを切り出し、精製した

。精製したDNA断片をpT7-blue vector (Novagen)にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてX-gal存在下でブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌よりplasmid DNAを精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。

【0060】

(6) 3'-RACE法

Degenerated PCRで得られたDNA断片の3'側部分は、(4)の塩基配列決定で得られた情報を基に作製したプライマーとオリゴdTプライマーのPCRで得た。鋳型として(2)で調整したfirst strand cDNAを3 μ l使用した。

【0061】

作成したプライマーは 5'-GGTATTCGCCAAATACCCAAA-3'(primer7) (配列番号9)

PCR反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X 10 taq バッファー	5 μ l
2.5 mM dNTPs	4 μ l
20 μ M primer3	1 μ l
10 μ M oligo dT primer	1 μ l
ミリQ	35 μ l
taq polymerase(5 U/ μ l)	1 μ l

【0062】

PCR反応条件

94 $^{\circ}$ C 1 分(PAD)
94 $^{\circ}$ C 30 秒(変性)
52 $^{\circ}$ C 30 秒(プライマーの鋳型へのアニーリング)
72 $^{\circ}$ C 1 分 (プライマー伸長)
上記3ステップを30サイクル行った。
72 $^{\circ}$ C 7 分 (最後の伸長)
4 $^{\circ}$ Cで保持

【0063】

アガロースゲル電気泳動で、増幅された500 bpのバンドを切り出し、精製した。精製したDNA断片をpT7-blue vector (Novagen)にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてX-gal存在下でブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌よりplasmid DNAを精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。

【0064】

(7) 全長cDNAの取得

得られた全長の塩基配列より蛍光蛋白質をコードするオープンリーディングフレームを決定した。N末端、C末端に相当する部分でプライマーを作製し、(2)で調製したFirst strand cDNAを鋳型としてPCRを行って全長のcDNAを得た。このクローンをMomijiと命名した。Momijiのアミノ酸配列を配列表の配列番号1に記載し、塩基配列を配列表の配列番号2に記載する。

【0065】

使用プライマー

5'- CCCGGATCCGACCATGGTGAGTGTGATTAAGGACGAAATG -3' (primer8) (配列番号10)

5'- CCGCTCGAGTTGTTGTTGTTTCTCTTTGTCCTG -3' (primer9) (配列番号11)

【0066】

PCR反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X 10 pyrobest バッファー	5 μ l
2.5 mM dNTPs	4 μ l
20 μ M primer4	1 μ l
20 μ M primer5	1 μ l
ミリQ	35 μ l
pyrobest polymerase(5 U/ μ l)	1 μ l

【0067】

PCR反応条件

94 °C 1 分(PAD)

94 °C 30 秒 (変性)

52 °C 30 秒 (プライマーの鋳型へのアニーリング)

72 °C 1 分 (プライマー伸長)

上記3ステップを30サイクル行った。

72 °C 7 分(最後の伸長)

4 °Cで保持

【0068】

実施例 2 : 大腸菌での蛋白発現

実施例 1 (7) で増幅された700 bpのバンドをアガロースゲルの電気泳動で、切り出し、精製してpET28 vector (Novagen)のNco I、Xho I 部位に挿入して、大腸菌株 (JM109-DE3) で発現させた。C末端にHis-tagが付くようにコンストラクトし、産生させた蛋白はNi-Agarose gel (QIAGEN)で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。以下、実施例 3 で、精製した蛋白 (Momiji) の性質を解析した。

【0069】

実施例 3 : 蛍光蛋白の解析

(1) 蛍光特性の解析

蛍光蛋白 (Momiji) 20 μ M、50 mM HEPES pH 7.4、150 mM KCl溶液を用いて、吸収スペクトルを測定した。さらに上記の緩衝液で20倍希釈し、蛍光スペクトル及び励起スペクトルを測定した。別にBradford法で求めた蛋白質濃度と吸収スペクトルのピークの値より、508 nmと578 nmにおけるモル吸光係数を計算した。450 nmの吸収が0.002となるように蛍光蛋白を同緩衝液で希釈し、450 nmで励起した時の蛍光スペクトルを測定した。EGFP (CLONTECH)を同様に450 nmの吸収が0.002となるようにして蛍光スペクトルを測定し、両スペクトルの面積比から今回クローニングされた蛍光蛋白の蛍光の量子収率を求めた。EGFPの蛍光の量子収率を0.6とした。測定結果等は表 1 及び図 1 に示す。

【0070】

【表 1】

	Momiji	EGFP
励起極大	508nm, 578nm	490nm
蛍光極大	518nm, 588nm	509nm
モル吸光係数	102250 (508nm), 76950 (578nm)	48850(490nm)
量子収率(蛍光)	0.43 (518nm), 0.51 (588nm)	0.600
pH感受性	pKa=5.8 (508nm), pKa=6.5 (578nm)	pKa=6.0
アミノ酸数	229a.a.	238a.a.

【0071】

(2) UVによるスペクトル変化の測定

本発明の蛍光蛋白 (Momiji) はUV(365 nm付近)の照射により、蛍光、及び、吸収スペクトルが変化するため、その変化を測定した。蛍光蛋白を50 mM HEPES pH 7.4、150 mM KCl溶液で希釈して、365 nmの光を照射し、365 nmで励起した時の蛍光スペクトルを測定した。また蛍光蛋白20 μ M、50 mM HEPES pH 7.4、150 mM KCl溶液を用いて、365 nmの光を照射した後の吸収スペクトルを測定した。測定結果等は図3及び図4に示す。なお、蛍光スペクトルと吸収スペクトルの測定を行ったときの365 nmの光量が違うため、蛍光スペクトルと吸収スペクトルの変化と時間は一致しない。

【0072】

(3) pH感受性の測定

pH 4から11の緩衝液で吸収スペクトルをとりpH感受性 (pKa) を測定した。

各pHの緩衝液は次の通り、

pH 4、5 : 酢酸バッファー

pH 6、11 : リン酸バッファー

pH 7、8 : HEPESバッファー

pH 9、10 : グリシンバッファー

測定結果等は表1及び図2に示す。

【0073】

【発明の効果】

本発明により、アザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) に由来する新規な一次構造を有する蛍光蛋白質を提供される。本発明の蛍光蛋白質は、紫外光に

よって色が緑色から赤色に変わることを特徴とし、光によって、特定の細胞、器官又は蛋白質をマーキング (optical marking) することが可能である。また、本発明の蛍光蛋白質によれば、紫外光によって非常に簡単に効率よく特異的に緑色から赤色への変換が可能であり、変換の前後の緑色及び赤色の両状態が非常に安定で明るいため実用的である。

【0074】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Fluorescent proteins

<130> A21613A

<160> 11

【0075】

<210> 1

<211> 229

<212> PRT

<213> Scolymia Vitiensis

<400> 1

Met Val Ser Val Ile Lys Asp Glu Met Lys Val Asn Leu Arg Met Glu

1 5 10 15

Gly Ser Val Asn Gly His Asp Phe Val Ile Asp Gly Leu Gly Ser Gly

20 25 30

Lys Pro Lys Glu Gly Thr Gln Thr Ile Glu Leu Lys Val Val Lys Gly

35 40 45

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr

50 55 60

Gly Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Lys Asp Ile Pro Asn Tyr Phe

65 70 75 80

Glu Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Ser Met Ile Phe

85	90	95
Glu Asp Gly Gly Ile Cys Ile Ala Arg Asn Asp Ile Thr Met Asp Gly		
100	105	110
Gly Thr Phe Tyr Asn Lys Val Arg Phe Tyr Gly Val Asn Phe Pro Pro		
115	120	125
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Lys Trp Glu Gln Ser Thr		
130	135	140
Glu Lys Met Tyr Ala Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Asn Met		
145	150	155
Ala Leu Leu Leu Lys Gly Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr		
165	170	175
Thr Phe Lys Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Leu Pro Gly Tyr His Phe		
180	185	190
Ile Asp His Cys Ile Glu Ile Leu Ser His Arg Asn Asp Tyr Asn Asn		
195	200	205
Val Thr Leu Phe Glu His Ala Val Ala Arg Ser Gly Leu Gln Asp Lys		
210	215	220
Glu Lys Gln Gln Gln		
225		

【 0 0 7 6 】

<210> 2

<211> 690

<212> DNA

<213> Scolymia Vitiensis

<400> 2

atg gtg agt gtg att aag gac gaa atg aaa gtc aac ctg cgt atg gaa 48

Met Val Ser Val Ile Lys Asp Glu Met Lys Val Asn Leu Arg Met Glu

1

5

10

15

ggc agt gta aac gga cac gac ttc gtg att gac gga ctt ggt tca ggc 96

Gly Ser Val Asn Gly His Asp Phe Val Ile Asp Gly Leu Gly Ser Gly
 20 25 30
 aag cct aaa gag gga aca cag act att gag ctt aaa gtc gta aag ggt 144
 Lys Pro Lys Glu Gly Thr Gln Thr Ile Glu Leu Lys Val Val Lys Gly
 35 40 45
 gga cct tta cct ttc gcc tac gat atc ctg aca aca gca ttc cat tac 192
 Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr
 50 55 60
 ggc aac cgg gta ttc gcc aaa tac cca aag gat ata cca aac tat ttc 240
 Gly Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Lys Asp Ile Pro Asn Tyr Phe
 65 70 75 80
 gag cag tcg ttt cct gag ggg tat tcg tgg gaa cgg agc atg att ttc 288
 Glu Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Ser Met Ile Phe
 85 90 95
 gaa gac ggg ggc att tgc atc gct aga aac gac ata aca atg gat ggt 336
 Glu Asp Gly Gly Ile Cys Ile Ala Arg Asn Asp Ile Thr Met Asp Gly
 100 105 110
 ggc act ttc tat aat aaa gtt cga ttt tat ggt gta aat ttc ccc ccc 384
 Gly Thr Phe Tyr Asn Lys Val Arg Phe Tyr Gly Val Asn Phe Pro Pro
 115 120 125
 aat ggt cca gtt atg cag aag aag acg cag aaa tgg gag caa tcc act 432
 Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Lys Trp Glu Gln Ser Thr
 130 135 140
 gag aaa atg tat gcg cgt gat gga gtg ttg acg ggt gat att aac atg 480
 Glu Lys Met Tyr Ala Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Asn Met
 145 150 155 160
 gct ctg ttg ctt aaa ggg ggt ggc cat tac cga tgt gac ttc aga act 528
 Ala Leu Leu Leu Lys Gly Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr
 165 170 175

act ttc aaa gct aag gag aag ggt gtc aag ttg cca ggc tac cac ttt 576

Thr Phe Lys Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Leu Pro Gly Tyr His Phe

180

185

190

ata gat cac tgc ata gag att tta agc cat cgc aac gat tac aac aac 624

Ile Asp His Cys Ile Glu Ile Leu Ser His Arg Asn Asp Tyr Asn Asn

195

200

205

gtt acg ctt ttt gag cat gct gtt gct cgt tct gga ttg cag gac aaa 672

Val Thr Leu Phe Glu His Ala Val Ala Arg Ser Gly Leu Gln Asp Lys

210

215

220

gag aaa caa caa caa tga

690

Glu Lys Gln Gln Gln

225

【0077】

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

atcaagntnw ryatggaagg

20

【0078】

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

acvggdccat ydgvaagaaa rtt

23

【0079】

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

ggccacgcgt cgactagtac gggiigggii gggiig

36

【0080】

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

agttcacacc atgatattca atatcata

28

【0081】

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

ggccacgcgt cgactagtac

20

【0082】

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

tcttcgtaag tcatgcttcg ttc

23

【 0 0 8 3 】

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

ggtattcgcc aaatacccaa a

21

【 0 0 8 4 】

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

cccgatccg accatggtga gtgtgattaa ggacgaaatg

40

【 0 0 8 5 】

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

ccgctcgagt tgttgttggt tctctttgtc ctg 33

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、本発明の蛍光蛋白質の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを示す。

【図 2】

図 2 は、本発明の蛍光蛋白質の pH 感受性を示す。

【図 3】

図 3 は、本発明の蛍光蛋白質に UV 365 nm を照射した場合の蛍光スペクトルの変化を示す。

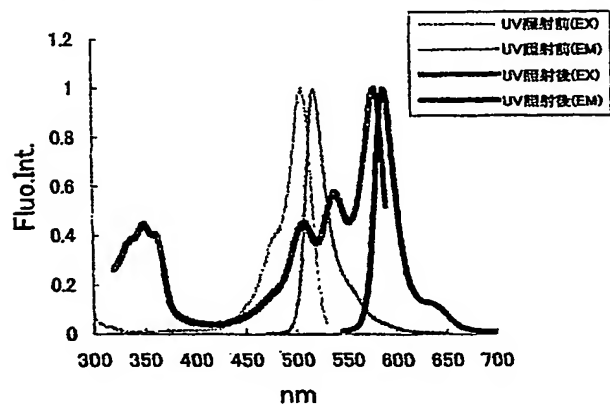
【図 4】

図 4 は、本発明の蛍光蛋白質に UV 365 nm を照射した場合の吸収スペクトルの変化を示す。

【書類名】 図面

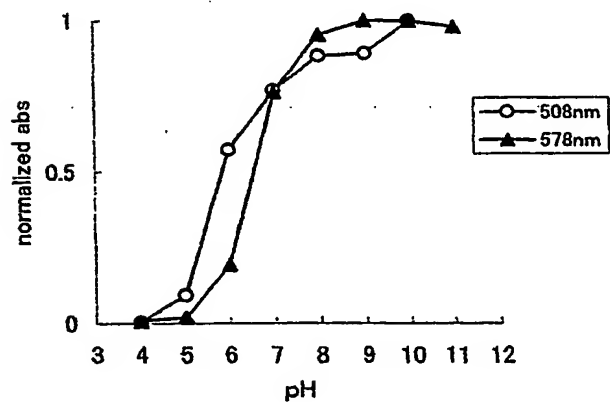
【図1】

Momijiの励起(EX)、蛍光(EM)スペクトル



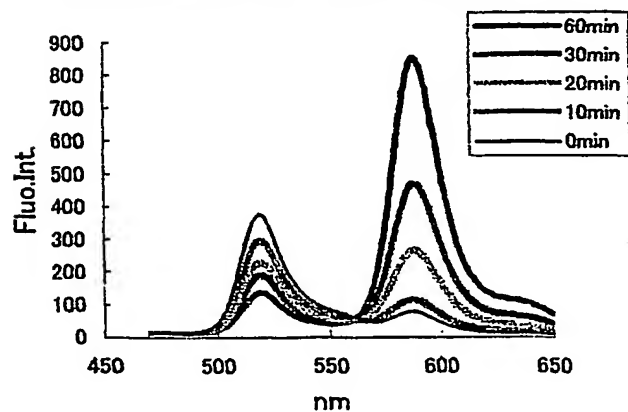
【図2】

pH感受性

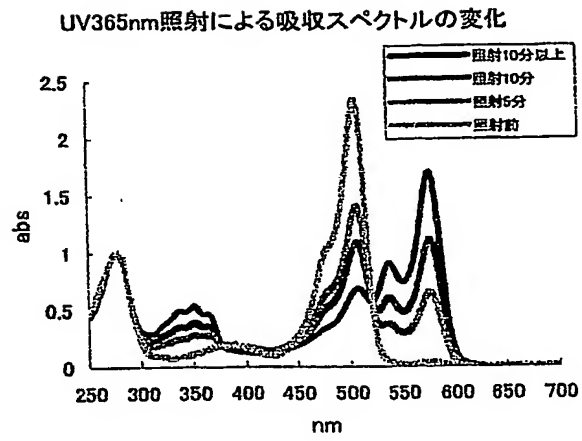


【図3】

UV365nm照射による蛍光スペクトルの変化



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 刺胞動物、特にアザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) に由来する新規な一次構造を有する蛍光蛋白質を提供すること。

【解決手段】 アザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

(1) 紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が 508 nm (緑) 及び 578 nm (赤) であり、蛍光極大波長が 518 nm (緑) 及び 588 nm (赤) である；

(2) 508 nm におけるモル吸光係数 (緑) が $102250\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ であり、 578 nm におけるモル吸光係数 (赤) が $76950\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ である；

(3) 量子収率 (蛍光) が 0.43 (緑) 及び 0.51 (赤) である；及び

(4) 緑色 (508 nm) の pH 感受性について pK_a が 5.8 であり、赤色 (578 nm) の pH 感受性について pK_a が 6.5 である。

【選択図】 なし

特願2002-280118

出願人履歴情報

識別番号

[000006792]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県和光市広沢2番1号

氏 名

理化学研究所

特願 2002-280118

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[390004097]

1. 変更年月日

1998年 7月22日

[変更理由]

住所変更

住 所

愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内
ビル5F

氏 名

株式会社医学生物学研究所